

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 3 月 21 日 (21.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/22847 A1(51) 国際特許分類:
C09B 61/00, C07H 17/065

C12P 19/14,

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門
5森ビル3F Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/07891

(22) 国際出願日: 2001 年 9 月 11 日 (11.09.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-276540 2000 年 9 月 12 日 (12.09.2000) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製
菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒
104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 松本 均 (MAT-
SUMOTO, Hitoshi) [JP/JP]. 花村 聡 (HANAMURA,
Satoshi) [JP/JP]. 平山 匡男 (HIRAYAMA, Masao)
[JP/JP]; 〒350-0289 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1
号 明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

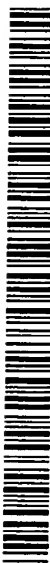
2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PURIFIED ANTHOCYANIN AND CRYSTALLINE ANTHOCYANIN

(54) 発明の名称: 精製アントシアニンの製造法および結晶性アントシアニン

(57) Abstract: A process for producing purified anthocyanidin glucoside characterized by comprising cleaving the rhamnose end of anthocyanidin rutinoside with rhamnosidase, converting the anthocyanidin rutinoside component into anthocyanidin glucoside and then purifying and isolating the anthocyanidin glucoside component; or a crystalline anthocyanidin glucoside salt obtained by further crystallizing the purified anthocyanidin glucoside and a process for producing the same. A process for producing anthocyanidin rutinoside characterized by comprising cleaving the glucose end of anthocyanidin glucoside with β -glucosidase, eliminating via decomposition and then purifying and isolating the anthocyanidin rutinoside component; or a crystalline anthocyanidin rutinoside salt obtained by further crystallizing the purified anthocyanidin rutinoside and a process for producing the same.

[続葉有]



WO 02/22847 A1



(57) 要約:

ラムノシダーゼを用いて、アントシアニジンルチノシドのラムノース末端を切断し、アントシアニジンルチノシド成分をアントシアニジングルコシドに変換させた後、アントシアニジングルコシド成分を精製して単離することを特徴とする精製アントシアニジングルコシドの製造法、あるいはこの精製アントシアニジングルコシドをさらに結晶化して得られる結晶性アントシアニジングルコシド塩およびその製造方法を提供する。

また、 β -グルコシダーゼを用いて、アントシアニジングルコシドのグルコース末端を切断し、分解除去した後に、アントシアニジンルチノシド成分を精製して単離することを特徴とする精製アントシアニジンルチノシドの製造法、あるいはこの精製アントシアニジンルチノシドをさらに結晶化して得られる結晶性アントシアニジンルチノシド塩およびその製造方法を提供する。

明 細 書

精製アントシアニンの製造法および結晶性アントシアニン

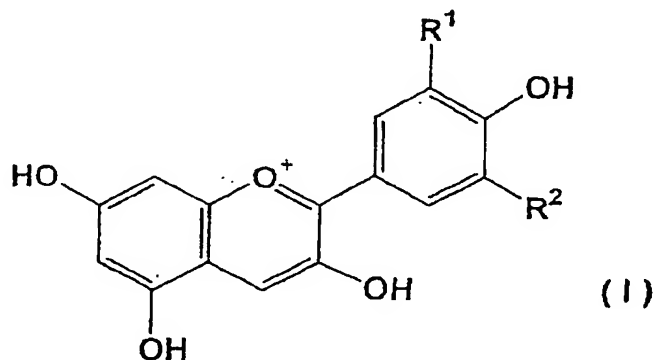
技術分野

本発明は、天然物由来のアントシアニンから精製アントシアニンを製造する方法および精製アントシアニンをさらに結晶化して結晶性アントシアニンを製造する方法、ならびに該製造法で調製される結晶性アントシアニンに関する。

さらに詳しくは、アントシアニン類を構成するアントシアニジンルチノシドまたはアントシアニジングルコシドを酵素的に変換または除去して、アントシアニジンルチノシドまたはアントシアニジングルコシドをより減少させることにより、以降の精製・結晶化工程を容易にすることを特徴とする方法である。

背景技術

アントシアニンとは、下記の式(I)に示される骨格を有するアントシアニジンとそれに糖が結合して配糖体となったアントシアニンとの総称である。



	R ¹	R ²
デルフィニジン	OH	OH
シアニジン	OH	H
マルビジン	OCH ₃	OCH ₃
ペラルゴニジン	H	H
ペオニジン	OCH ₃	H
ペチュニジン	OCH ₃	OH

アグリコンであるアントシアニンとしては、例えばデルフィニジン (Delphinidin)、シアニジン (Cyanidin)、マルビジン (Malvidin)、ペラルゴニジン (Pelargonidin)、ペオニジン (Peonidin)、ペチュニジン (Petunidin) などがある。アントシアニンは例えば、上記アントシアニンにグルコースが配糖体として結合している場合はアントシアニングルコシドと呼ぶ。また、アントシアニンに見いだされる糖としては単糖類であるグルコース以外に、ガラクトース、アラビノースや2糖類であるルチノース、ソフォロースなどがある。

アントシアニン類は自然界に幅広く存在し、主に天然系色素として食品、あるいはその機能性から欧州では、医薬品、医薬部外品、化粧品などに幅広く使用されている。例えば特公昭 59-53883 号に記載されるような瘢痕形成剤としての利用、あるいは、特開平 3-81220 号公報に記載されるようなブルーベリー由来のアントシアニンを用いた末梢血管の疾病治療について価値ある薬理的性質が見出されている。昨今日本国内でもアントシアニンの色素以外の利用法としてアントシアニンの機能性に注目が集まってきている。本発明者らも、カシス (英名 Black currant, 和名黒フサスグリ) のアントシアニンにいくつかの有用な効能を見出し、報告 (WO01/01798) している。

しかし、薬理的性質を持つこれらアントシアニンを医薬品などとして用いる場合には、高純度に精製されたものが求められるのに対して、高純度に精製され

た精製アントシアニンが大量に製造された例は過去になかった。また高純度アントシアニンは安定性・吸湿性などの面から好ましくは結晶製品が求められるが、結晶性アントシアニンが大量に製造された例も過去に無かった。

また、従来の医薬品用のアントシアニン組成物は主にブルーベリー由来の製剤であるが、アントシアニン含有量が 25 重量%以下であり、有効性を発揮するためにはアントシアニン製剤として少なくとも 1 回当たり数百 mg も投与しなくてはならず、少量の摂取で薬理学的な効果を出すことは事実上不可能であり、高純度の精製アントシアニンを含むアントシアニン高含有組成物が求められていた。

高純度の精製アントシアニンが存在しなかった理由は、ブルーベリー由来のアントシアニンを例にとるとアントシアニン成分が 15 種も存在しており、それらの物質の物理化学的性質が非常に似ているために分取用カラムなどによる精製においてそれぞれの流出ピークが重なってしまうことや、また、それぞれの成分が非常に少量であるために分離精製が不可能であったためである。

また、カシス由来のアントシアニンを例にあげると、シアニジン-3-O-グルコシド（以下 C3G と略記する。）、シアニジン-3-O-ルチノシド（以下 C3R と略記する。）、デルフィニジン-3-O-グルコシド（以下 D3G と略記する。）およびデルフィニジン-3-O-ルチノシド（以下 D3R と略記する。）の 4 成分がアントシアニン類として含まれているが、ブルーベリー由来のアントシアニンと同様に該 4 物質の物理化学的性質が非常に似ているために、これら 4 成分の混合物であってもクロマトピークが接近しており、分取用クロマトグラフィーや遠心分配クロマトグラフィーを用いて精製アントシアニンを得ようとしても極端な収率の低下を伴うため大量調製は不可能であった。また、カシス中の代表的なアントシアニン類の量比は D3G, D3R, C3G 及び C3R がそれぞれ、12.5%、47.9%、4.1%

及び 35.5%であり、含有量の低い D3G, C3G 成分を大量精製するのは更に困難であり、精製アントシアニンを大量に製造する方法が求められていた。

一方、従来からアントシアンは安定性に問題のあることが判っており、本発明者らは、アントシアニン高含有物の安定化剤としてフィチン酸、糖類、糖アルコール類を添加することによる安定化法を特許出願 (PCT/JP00/09204) している。しかし、アントシアニンを高含有量で使用して製剤化する時には、このような添加物を入れる余地がないために、さらに安定性の高い物性が要請されており、より物理的に安定な結晶形態のアントシアニンを使用した製剤が求められていた。そのため、従来医薬品用途として高純度アントシアニンは、例えば特許第 3030509 号に記載のデルフィニジン塩酸塩（配糖体ではなくアグリコンのアントシアニジン塩酸塩）の合成法などにより、いくつもの段階を経て有機合成されていたが、天然物から大量に調製された例はなかった。

また、合成法によって製造されたアントシアニジン塩酸塩は、強酸性条件下では安定であるが、弱酸性から中性領域では配糖体に比べ分解されやすいことが判明しており、その応用範囲は甚だ狭いものになっていた。従って、酸性から中性領域でより安定なアントシアニンを結晶として調製することが求められていたが、有機合成法によりアントシアニンを大量に調製することは現状ではできていない。

アントシアニン類の特性は、Dictionary of natural products(Chapman & HALL 社刊, 1994, London)に列記されている。例を挙げて引用すると、D3R の結晶は従来報告されておらず、D3G 塩酸塩の結晶形に関する報告はあるが融点の記載はなく大量に調製することが難しかったことがわかる。同様に C3R 塩酸塩については、融点、結晶形共に記載があるが、C3G 塩酸塩では融点の記載はなく大量に調製することが難しかったことがわかる。従来までは、結晶、非結晶

を問わず精製されたアントシアニンが、微量にしか調製できなかったため、各種酵素のアントシアニンへの反応性を調べた研究はほとんどなかった。特に、ラムノシダーゼのアントシアニンに対する反応性を述べたものは皆無であった。以上のことより、煩雑な合成法を用いずに高純度の精製アントシアニンを天然物より大量に製造する方法が求められ、さらに精製アントシアニンを結晶化した結晶性アントシアニン塩を大量に製造する方法が求められていた。

発明の開示

本発明はラムノシダーゼを用いて、アントシアニジニルチノシドのラムノース末端を切断し、アントシアニジニルチノシド成分をアントシアニジニグルコシドに変換させた後、アントシアニジニグルコシド成分を精製して単離することの特徴とする精製アントシアニンの製造法、あるいはこの精製アントシアニンをさらに結晶化して、結晶性アントシアニジニグルコシド塩・水和物を製造する方法に関する。

また別の本発明は、 β -グルコシダーゼを用いて、アントシアニジニグルコシドのグルコース末端を切断し、分解除去した後に、アントシアニジニルチノシド成分を精製して単離することの特徴とする精製アントシアニンの製造法、あるいはこの精製アントシアニンをさらに結晶化して、結晶性アントシアニジニルチノシド塩・水和物を製造する方法に関する。

さらにまた別の本発明は、これらの製造法を用いて調製された結晶性アントシアニン塩・水和物に関するものである。

本発明を具体的に説明すると、第1発明は少なくとも1種以上のアントシアニジニルチノシドを含有するアントシアニン組成物にラムノシダーゼを作用させ、アントシアニジニルチノシドを加水分解することによりアントシアニジニグルコシドに変換させた後、アントシアニジニグルコシドを単離し、精製すること

を特徴とする、精製アントシアニジングルコシドを製造する方法を提供する。

第 2 の発明は少なくとも 1 種以上のアントシアニジングルコシドとアントシアニジニルチノシドを含有するアントシアニン組成物に β -グルコシダーゼを作用させ、アントシアニジングルコシドを加水分解し、アントシアニジングルコシドを減じせしめた後、アントシアニジニルチノシドを単離し、精製することを特徴とする、精製アントシアニジニルチノシドを製造する方法を提供する。

上記の第 1 及び第 2 の発明において、アントシアニン組成物としてはカシス、イチジク、コーヒー、バナナ、ブラックベリーなどから選択される一種以上の果実から得られる果汁および/またはアメリカマコモ、サトイモなどから得られるアントシアニン濃縮物が挙げられる。ラムノシダーゼとしてはヘスペリジナーゼ、ナリンジナーゼ等が挙げられる。また、 β -グルコシダーゼとしてはアントシアニジニルチノシドの β -グルコシド結合は分解せずに、アントシアニジングルコシドの β -グルコシド結合のみを選択的に分解できる酵素であり、その具体例としてはアーモンド由来のものが挙げられる。

第 3 の発明は下記の工程を経て結晶性アントシアニン-3-O-グルコシド塩酸塩・水和物を製造する方法を提供する。

- a) 少なくとも 1 種以上のアントシアニジニルチノシドを含有するアントシアニン組成物にラムノシダーゼを作用させ、アントシアニジニルチノシドを加水分解することによりアントシアニジングルコシドに変換する。
- b) 該アントシアニジングルコシドを精製することにより純度 99% 以上のアントシアニジングルコシドを得る。
- c) 該アントシアニジングルコシドを塩酸/アルコール系の混合溶媒を用いて結晶化する。

第 4 の発明は上記第 3 の発明の方法により得られる結晶性アントシアニン

-3-O-グルコシド塩酸塩・水和物を提供する。

第5の発明は下記の工程を経て結晶性アントシアニン-3-O-ルチノシド塩酸塩・水和物を製造する方法を提供する。

- a) 少なくとも1種以上のアントシアニジングルコシドとアントシアニンルチノシドを含有するアントシアニン組成物に β -グルコシダーゼを作用させ、アントシアニジングルコシドを加水分解することによりアントシアニジングルコシドを減じせしめる。
- b) 該アントシアニンルチノシドを精製することにより純度99%以上のアントシアニンルチノシドを得る。
- c) 該アントシアニンルチノシドを塩酸/アルコール系の混合溶媒を用いて結晶化する。

第6の発明は上記第5の発明の方法により得られる結晶性アントシアニン-3-O-ルチノシド塩酸塩・水和物を提供する。

上記の第3及び第5の発明において、b)工程の精製法としてはイオン交換吸着クロマトグラフィーおよび/またはHPLCを用いることができ、c)工程の塩酸/アルコール系の混合溶媒としては5% (V/V) 塩酸/95% (V/V) メタノールをもちいることができる。

第7の発明は下記の物理的性質を有する結晶性デルフィニン-3-O-グルコシド塩酸塩・0.5水和物を提供する。

熱分析による融点：258℃

Uv λ max(ϵ)：517nm (27500)

FAB-MS m/z：M⁺：465

組成式：C₂₁H₂₁O₁₂Cl・0.5H₂O

元素分析値： C H Cl

測定値： 48.00 4.50 6.80

第 8 の発明は下記の物理的性質を有する結晶性シアニジン・3-O-グルコシド塩酸塩・0.5 水和物を提供する。

熱分析による融点：245℃

Uv $\lambda_{\max}(\epsilon)$: 510 nm (26300)

FAB-MS m/z : M⁺ : 449

組成式：C₂₁H₂₁O₁₁Cl · 0.5H₂O

元素分析値： C H Cl

測定値： 48.80 4.70 6.90

第 9 の発明は下記の物理的性質を有する結晶性デルフィニジン・3-O-ルチノシド塩酸塩・1.5 水和物。

熱分析による融点：224℃

Uv $\lambda_{\max}(\epsilon)$: 520 nm (27800)

FAB-MS m/z : M⁺ : 611

組成式：C₂₇H₃₁O₁₆Cl · 1.5H₂O

元素分析値： C H Cl

測定値： 45.80 5.30 5.20

第 10 の発明は下記の物理的性質を有する結晶性シアニジン・3-O-ルチノシド塩酸塩・0.5 水和物を提供する。

熱分析による融点：214～226℃

Uv $\lambda_{\max}(\epsilon)$: 512 nm (27400)

FAB-MS m/z : M⁺ : 595

組成式：C₂₇H₃₁O₁₅Cl · 0.5H₂O

元素分析値： C H Cl

測定値： 50.00 5.30 5.30

本明細書においてアントシアニンとは、アグリコンであるアントシアニジンに糖類が結合した配糖体のことを示し、グルコース、ルチノース、アラビノース、ガラクトースなどの糖類が結合したグルコシド、ルチノシド、アラビノシド、ガラクトシドなどを含む。

本発明において酵素反応に用いられる少なくとも1種以上のアントシアニジングルコシドおよび/またはアントシアニジンルチノシドを含有するアントシアニン組成物としては、アントシアニンを含むいかなるものでもよく、市販の果汁、濃縮ジュース、飲料、色素溶液、あるいは食品医薬品などの原料となる粉末などがあげられる。濃縮ジュースとして好ましくは、カシス、イチジク、コーヒー、バナナ、ブラックベリーなどから選択される一種以上の果実から得られる果汁および/またはアメリカマコモ、サトイモなどから得られるアントシアニン濃縮物がよい。また、該粉末を水や緩衝液などに溶解してから、反応に用いる。より好ましくは、本発明者らがWO01/01798に報告した方法で調製したアントシアニン高含有組成物を用いるのがよく、事前に酸類・糖類・ポリフェノール類などが除去されているので、酵素反応後の精製工程において操作が容易になる。

本発明の精製アントシアニンの製造法におけるアントシアニンのアグリコンの種類は、特に限定はしない。好ましくはカシス由来のアントシアニン類およびその塩がよい。カシス由来のアントシアニンのアグリコン部分は、デルフィニジンとシアニジンのみであるが、酵素反応では、特にこの2種類のアントシアニンにおける特異性があるとは考えられず、他のアントシアニジンの配糖体、例えば、式(I)に示されるマルビジン、ペラルゴニジン、ペチュニジン、ペオニジンなどの配糖体にも応用可能である。なお、カシス由来のアントシアニン成分の組

成は、シアニジン-3-O-グルコシド(C3G)、シアニジン-3-O-ルチノシド(C3R)、デルフィニジン-3-O-グルコシド(D3G)、デルフィニジン-3-O-ルチノシド(D3R)の4成分からなっている。

また、結晶性アントシアニン塩を構成する塩の種類は、塩酸、硫酸などの鉱酸、リン酸、トリフルオロ酢酸(TFA)、酢酸などの有機酸の塩（フラビニウム塩）が含まれるが、結晶のしやすさなどから、塩酸、TFA、リン酸との塩が好ましい。

本発明に用いられるラムノシダーゼとしては、動物、植物、微生物など特に起源は問わないが、作用機作としてアントシアニン末端の α -ラムノシダーゼ活性をもつものであればよいが、この際に注意しなくてはならないのは β -グルコシダーゼ活性が低いことが重要である。さらには、アントシアニンは、中性から塩基性領域に長時間放置すると分解することが知られており、さらに加温により分解が促進されることが知られている。よって、pH4.0以下、温度40℃以下で高い活性を持つことが必要である。好ましくは、ヘスペリジナーゼまたはナリンジナーゼがあげられ、より好ましくは、ヘスペリジナーゼがあげられる。ヘスペリジナーゼは、温州みかんの白濁成分であるヘスペリジンを分解することを目的として工業的に生産されている *Aspergillus niger* 由来のものがあげられる。なお、これまで *Aspergillus niger* 由来のヘスペリジナーゼのアントシアニンに対する反応作用は知られていなかった。ナリンジナーゼも落果みかんや夏みかんなどの苦味成分であるナリンジンを分解して呈味改善などに用いられている

Aspergillus niger 由来のものなどがあげられる。なお、*Aspergillus niger* 由来のナリンジナーゼのアントシアニンに対しての応用は報告されていなかった。

本発明に用いられる β -グルコシダーゼとしては、特にその起源は問わないが、アントシアニンに対して反応しなくてはならないのは当然のこととして、アントシアニジンルチノシドの β -グルコシド結合を分解せず、アントシアニジングル

コシドの β -グルコシド結合のみを分解する基質特異性が必要である。つまり、末端のグルコースにのみ反応し、分子内の中央部のグルコースには反応しないものが適している。また、ラムノシダーゼと同様に pH4.0 以下、温度 40℃ 以下で高い活性を持つことが必要である。好ましくは、アーモンド由来の β -グルコシダーゼがあげられる。なお、アーモンド由来の β -グルコシダーゼは、代表的な β -グルコシダーゼであるが、アントシアニンに対する反応性を調べた研究は存在しなかった。

β -グルコシダーゼのアントシアニンに対する反応処理の例としては、従来からブドウ汁、ピーチネクター等の果汁工業やワイン、シャンパンなどを含むスパークリングワインなどのワイン工業で β -グルコシダーゼの一種であるアントシアナーゼを脱色、脱苦味に用いていることがあげられる。しかし、アントシアナーゼは、アントシアニンのグルコシドとルチノシド双方に反応し、分解してしまうために、精製アントシアニンの製造には不向きである。

これらの酵素をアントシアニンに作用させる反応条件は、とくに限定はしないが上記のようにアントシアニンは、中性から塩基性領域に長時間放置すると分解することが知られており、さらに高温により分解が促進されることが知られているため、酸性領域が好ましく、高温で反応させないことが好ましい。具体的には、pH4.0 以下、温度 40℃ 以下で反応させるのが最も好ましいと考えられる。

酵素反応に用いるアントシアニン含有物中の基質の濃度は、特に限定されないが、極端に高濃度であると、反応液の粘性が増大し反応速度が落ち、また反応液中に存在する物質による阻害反応や、基質に対する転移反応などが心配されるため、基質濃度として 10 (w/v) % 以下が好ましく、より好ましくは 5 (w/v) % 以下である。また、酵素の添加量は、反応時間との関連で特に限定するものではない。

ラムノシダーゼまたは β -グルコシダーゼによる酵素反応によってアントシアニン含有物における基質、すなわち、アントシアニジンルチノシドまたはアントシアニジングルコシドの含有量を減じせしめた後の酵素反応の停止法としては、通常用いられる方法である、加熱する温度上昇法、酸アルカリなどを加える pH 調整法、有機溶媒添加法などが可能であるが、上記のようにアントシアニン類は中性から塩基性領域では不安定であり、加熱によって分解が促進されるため、好ましくは、塩酸、TFA、リン酸などの強酸の添加による pH 低下法、あるいはメタノールなどの有機溶媒添加法による酵素反応停止が望ましい。

本発明において、酵素反応終了後の精製方法は、カラムクロマトグラフ法以外にも、必要に応じて他のクロマトグラフ法、樹脂吸着法や膜分離法などを適宜組み合わせて行うことが可能である。中でも、ODS シリカゲルを用いたクロマトグラフ法が最も好ましい。また、必要に応じて予め陽イオン交換樹脂などにアントシアニン成分を吸着させた後、溶出させることにより、予備精製を行ったものを同様に精製してもよい。

本明細書においてアントシアニン含有量は、PCT/JP00/09204 または WO01/01798 に記載してあると同様に、含まれるアントシアニンの各成分の含有量を合計したものであり、HPLC によるアントシアニンのピーク面積比によって算出する。

すなわち、最初に、重量既知のアントシアニン標品を HPLC で分析し、520nm におけるピーク面積から検量線を作成し、各アントシアニン成分の含量を求める。さらに、各成分の含量をピーク面積で除した応答係数、即ち mg/ピーク面積を得る。次に、アントシアニン含有サンプルを HPLC 分析し、それぞれの成分のピーク面積に標品から求めた応答係数を乗じて、それぞれの成分含有量を計算し、注入量との比からアントシアニン純度を重量 (w/w) % として求める。そのた

め、アントシアニンの純度はアグリコンであるアントシアニジンの量だけでなく、結合している糖の量も含むものとして算出される。本発明の精製アントシアニンの純度は、HPLC分析によれば純度 99%以上である。

本発明における結晶化方法は、主に有機溶媒からの結晶化が好ましく、メタノールを結晶化溶媒とするのが好ましい。この際に、アントシアニン類は、酸との塩を作って結晶となるため、結晶化溶媒中に酸を添加しておくことが好ましく、1%～5% (V/V) 程度の塩酸、TFA、リン酸などを添加しておくことが好ましい。

後記の実施例 1 または 3 で調製された結晶 D3G、結晶 D3R、結晶 C3G、結晶 C3R の熱分析を行ったところ、以下のような結果となった。

D3G の 融点は 258℃であり、D3R の 融点は 224℃であり、C3G の 融点は 245℃であり、C3R の 融点は 214～226℃である。

本発明の結晶性アントシアニン塩は、偏光顕微鏡観察、元素分析、融点測定、HPLC 分析により 99%以上の純度を有する結晶であり、吸湿性もなく融点も 200℃以上で大変安定な物質である。

従来は高純度の精製アントシアニンや結晶性アントシアニン塩を製造することはできなかったが、本発明の製造法を用いることにより、天然物から精製する形で高純度の精製アントシアニンならびに結晶性アントシアニン塩を製造することができた。このようにして製造された結晶性アントシアニン塩は吸湿性を示さず、安定な性状であった。

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の実施例、参考例および比較例によりさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

参考例 1 アントシアニン高含有組成物の調製

WO01/01798 に記載される方法に従ってアントシアニン高含有組成物を調製

した。すなわち、市販のカシス濃縮果汁 3Kg（固形分当たりのアントシアニン純度 2.8%）を水で希釈し、Bx.10 の濃度に調製した。この希釈果汁を濾紙で濾過して異物を除去した後、日東電工社製の膜分離装置（NTR-7410）を用い、膜分離を行った。膜分離により得られた濃縮液をスプレードライすることにより粉末状のアントシアニン高含有組成物を得た。本組成物のアントシアニン純度は固形分当たり 14.1%であった。本組成物は、室温に放置しておくとき吸湿性を有した。

実施例 1 ヘスペリジナーゼを用いた精製デルフィニジン-3-O-グルコシドと精製シアニジン-3-O-グルコシドの製造

参考例 1 で得られた粉末 40g（アントシアニン純度は 14.1%であり、アントシアニンの各成分割合は、D3G、D3R、C3G 及び C3R はそれぞれ、12.5%、47.9%、4.1% 及び 35.5%である。）を 50mM 酢酸緩衝液(pH3.5) 1L に溶解してアントシアニン基質溶液とした。なお、基質溶液中のアントシアニンの含有量は計算では 5.64g であり、D3G、D3R、C3G 及び C3R の含有量はそれぞれ 0.71g、2.70g、0.23g 及び 2.00g となる。

別途、田辺製薬社製ヘスペリジナーゼ（商品名ヘスペリジナーゼ田辺二号）79.35g を 50mM 酢酸緩衝液(pH3.5) 1L に溶解しておき、酵素溶液とした。（ラムノシダーゼ活性 42.5U/ml に相当する）

基質溶液と酵素溶液をそれぞれ 40℃に加温した後、混合し反応を開始した。反応は 40℃で 6 時間行い、3% (W/V) リン酸溶液 2L を加え反応を停止させた。続いてイオン交換樹脂 XAD-7（ロームアンドハース社製）4 L をカラム（内径 13 cm X 長さ 30 cm）に充填し、その反応混合液（4 L）を通液させ、アントシアニン成分を吸着させた。次に、0.1% (W/V) TFA(2 L)を通液し非吸着成分を洗浄した。さらに、0.1%TFA を含む 80% (V/V) メタノール水溶液を

通液し、吸着成分を溶出した。このメタノール溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、固形分濃度として 10% (W/V) になるように 3% リン酸水溶液に転溶することにより濃縮液を得た。

本濃縮液を ODS-120T シリカゲルカラムを用い（東ソー社製、ID5.5×30cm, 20 μ m）、0.1%TFA を含む 9% (V/V) アセトニトリル水溶液で流速 80ml/分で 520nm の波長で検出し、R.T. (Retention Time) が 66-90 分の D3G 画分と 158-200 分の C3G 画分を得た。これらの画分は、HPLC 分析により単一ピークであり、純度 99% 以上の精製デルフィニジン-3- α -グルコシドと精製シアニジン-3- α -グルコシドを調製することが出来た。

なお、純度測定のための HPLC 分析条件は以下の通りである。即ち、ヒューレットパッカードシリーズ 1100(横川アナリチカルシステムズ社製)HPLC システムを用いて以下のようなグラジエント条件で分析を実施した。

HPLC グラジエント条件：

時間(分)	A 液 (0.5% リン酸水溶液)	B 液 (メタノール)
0	80	20
15	77	23
20	77	23
30	50	50
40	50	50

カラムは、ヒューレットパッカード社製 Zorbax SB-C18, 4.6mm × 250mm, 5 μ m を用いた。流速は 1ml/min、検出は波長 520nm で測定した。標品の D3G および C3G の R.T. はそれぞれ、10.54 分、14.60 分であった。

また、酵素反応前の基質溶液と酵素反応を停止させた溶液の一部を採取し、孔径 0.45 μ m のマイクロフィルターで異物を除去してアントシアニジングルコシ

ド液を調製した。反応前と反応後のアントシアニン成分の含有量を測定した。結果は表 1 に示したとおりである。基質溶液中のアントシアニジンルチノシドが分解されてアントシアニジングルコシドが生成し、アントシアニジングルコシドのみの組成となっていることが示されている。しかも、反応前と比べて D3G で 3.36 倍、C3G で 6.78 倍に増加していることが示されている。

表 1

アントシアニン含有量の変化

	D3G	D3R	C3G	C3R
反応前	0.71 g	2.70 g	0.23 g	2.00 g
反応後	2.39 g	0.00 g	1.56 g	0.00 g

実施例 2 結晶性デルフィニジン-3-O-グルコシド塩酸塩・水和物と結晶性シアニジン-3-O-グルコシド塩酸塩・水和物の製造

実施例 1 で得られた D3G 画分と C3G 画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、30ml のヘプタンを加え再度濃縮乾固し、分離操作中に混入する TFA を除去した。重量測定したところ、得られた D3G 画分は 1.51g であり、C3G 画分は 0.98g であった。

上記の D3G 画分及び C3G 画分をそれぞれ別個に 5%塩酸/95%メタノールに溶解後、5℃で 24 時間静置し結晶化を行った。桐山ロートと Whatman 社製 NO.2 の濾紙を用いて固液分離を行い、さらに少量のアセトンで洗浄後乾燥し、析出物を得た。得られた両析出物は偏光顕微鏡で観察すると偏光が観測され結

晶形であることがわかった。収量は結晶性 D3G 塩酸塩が 1.06g であり、結晶性 C 3G 塩酸塩は 0.59g であった。

得られた結晶性 D3G 塩酸塩と結晶性 C3G 塩酸塩について NMR による構造決定を実施した。これらの 2 種のアントシアニンは従来報告のあるスペクトルデータと一致した。

また、結晶性 D3G 塩酸塩と結晶性 C3G 塩酸塩のその他の物性値は以下の通りである。

結晶性 D3G 塩酸塩：

熱分析による融点：258℃

Uv $\lambda_{\max}(\epsilon)$ ：517nm (27500)

FAB-MS m/z：M⁺：465

組成式：C₂₁H₂₁O₁₂Cl · 0.5H₂O

元素分析値：	C	H	Cl
測定値：	48.00	4.50	6.80
計算値：	47.78	4.58	6.72

結晶性 C3G 塩酸塩：

熱分析による融点：245℃

Uv $\lambda_{\max}(\epsilon)$ ：510 nm (26300)

FAB-MS m/z：M⁺：449

組成式：C₂₁H₂₁O₁₁Cl · 0.5H₂O

元素分析値：	C	H	Cl
測定値：	48.80	4.70	6.90
計算値：	49.57	4.73	6.93

実施例 3 アーモンド由来の β -グルコシダーゼを用いた精製デルフィニジン-3-O-ルチノシドと精製シアニンジン-3-O-ルチノシドの製造

参考例 1 で得られた粉末 3.42g を 50mM 酢酸緩衝液(pH3.5)1L に溶解して、アントシアニン基質溶液とした。

別途、SIGMA 社製のアーモンド由来の β -グルコシダーゼ 208g を 50mM 酢酸緩衝液(pH3.5)1 L に溶解して酵素液とした (500U/ml に相当)。基質溶液 1L を 40℃で 10 分間保温して温度を安定させた後、酵素溶液 1L を加えてよく攪拌し反応を開始した。60 分経過後、2L の 0.3N 塩酸を加え反応を停止した。

続いて反応を停止させた反応混合液 4L を実施例 1 に記載されている方法と同様にイオン交換樹脂吸着によって処理して、さらに、ODS シリカゲルカラムを用いた HPLC によって精製することにより R.T が 69-96 分の D3R 画分と 144-174 分の C3R 画分を得た。

これらの画分は、実施例 1 記載の HPLC 分析条件 (標品 D3R および C3R の R.T はそれぞれ、12.63 分、18.19 分) で分析した結果、上記 D3R 画分と C3R 画分は単一ピークであった。従って、純度 99% 以上の精製デルフィニジン-3-O-ルチノシドと精製シアニンジン-3-O-ルチノシドが調製できた。

また、HPLC により測定した反応前の基質溶液と反応後の溶液におけるアントシアニン含有量を表 2 に示した。表 2 によればアントシアニングルコシドのみが分解され、アントシアニンルチノシドは大部分が分解されずに残っており、精製に最適な組成の反応液が得られていた。

表 2

アントシアニン含有量の変化

	D3G	D3R	C3G	C3R
反応前	60.3mg	231mg	19.8mg	171mg
反応後	5.6mg	207mg	0.0mg	162mg

実施例 4 結晶性デルフィニジン-3-オールチノシド塩酸塩・水和物と結晶性シアニジン-3-オールチノシド塩酸塩・水和物の製造

実施例 2 と同様の結晶化工程を経て、析出物を得た。得られた両析出物は偏光顕微鏡で観察すると偏光が観測され結晶形であることがわかった。収量は結晶 C3R 塩酸塩が 58mg であり、結晶 D3R 塩酸塩が 88mg であった。

得られた結晶性 D3R 塩酸塩と結晶性 C3R 塩酸塩について NMR による構造決定を実施した。これらの 2 種のアントシアニンは従来報告のあるスペクトルデータと一致した。

また、結晶性 D3R 塩酸塩と結晶性 C3R 塩酸塩の物性値は下記の通りである。

結晶性 D3R 塩酸塩：

熱分析による融点：224℃

Uv $\lambda_{\max}(\epsilon)$ ：520 nm (27800)

FAB-MS m/z：M⁺：611

組成式：C₂₇H₃₁O₁₆Cl · 1.5H₂O

元素分析値：	C	H	Cl
測定値：	45.80	5.30	5.20
計算値：	45.86	5.38	4.98

結晶性 C3R 塩酸塩：

熱分析による融点：214～226℃

Uv $\lambda_{\max}(\epsilon)$ ：512 nm (27400)

FAB-MS m/z ： M^+ ：595

組成式： $C_{27}H_{31}O_{15}Cl \cdot 0.5H_2O$

元素分析値：	C	H	Cl
測定値：	50.00	5.30	5.30
計算値：	49.97	5.13	5.46

比較例 1 市販のアントシアナーゼを用いた酵素反応

参考例 1 で得られた粉末 342mg を 50mM 酢酸緩衝液(pH3.5)100ml に溶解して、アントシアニン基質溶液とした。

別途、果汁工業に用いられる代表的なアントシアナーゼの一種、GIST-brocades 社製 商品名 CYTOLASE PCL5 を 50mM 酢酸緩衝液(pH3.5) で 10 倍に希釈することにより酵素液を得た。

基質溶液 2ml を 40℃で 10 分間保温して温度を安定させた後、酵素溶液 2ml を加えてよく攪拌し反応を開始した。15 分経過後 200 μ l の反応液をサンプリングし、200 μ l の 0.3N 塩酸を加え反応を停止した。

反応前と反応後のアントシアニン組成を HPLC で測定した。反応前後のアントシアニンの含有量と組成を以下の表 3 に示した。アントシアニンジングルコシド、アントシアニジンルチノシドの双方が分解されておりアントシアニン配糖体の精製には適さないことが判明した。

表 3

アントシアニン含有量の変化

	D3G	D3R	C3G	C3R
反応前	0.60mg	2.31mg	0.20mg	1.71mg
反応後	0.23mg	0.09mg	0.26mg	0.04mg

産業上の利用の可能性

本発明により、天然物から精製する形で高純度の精製アントシアニン並びに結晶性アントシアニン塩を製造することができた。このようにして製造された結晶性アントシアニン塩は吸湿性を示さず、安定な性状であった。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2 0 0 0 - 2 7 6 5 4 0 号の明細書に記載された内容を包含する。そして、本明細書中で引用した全ての刊行物、特許、特許出願をそのまま参考として本明細書中に取り入れるものとする。

請 求 の 範 囲

1. 少なくとも1種以上のアントシアニジンルチノシドを含有するアントシアニン組成物にラムノシダーゼを作用させ、アントシアニジンルチノシドをアントシアニジングルコシドに変換させた後、アントシアニジングルコシドを単離し、精製することを特徴とする、精製アントシアニジングルコシドを製造する方法。
2. アントシアニン組成物がカシス、イチジク、コーヒー、バナナ、ブラックベリーから選択される一種以上の果実から得られる果汁および/またはアメリカマコモ、サトイモから得られるアントシアニン濃縮物である請求項1記載の精製アントシアニジングルコシドを製造する方法。
3. ラムノシダーゼがヘスペリジナーゼ、ナリンジナーゼである請求項1または2記載の精製アントシアニジングルコシドを製造する方法。
4. 少なくとも1種以上のアントシアニジングルコシドとアントシアニジンルチノシドを含有するアントシアニン組成物に β -グルコシダーゼを作用させてアントシアニジングルコシドを減じせしめた後、アントシアニジンルチノシドを単離し、精製することを特徴とする、精製アントシアニジンルチノシドを製造する方法。
5. アントシアニン組成物がカシス、イチジク、コーヒー、バナナ、ブラックベリーから選択される一種以上の果実から得られる果汁および/またはアメリカマコモ、サトイモから得られるアントシアニン濃縮物である請求項4記載の精製アントシアニジンルチノシドを製造する方法。
6. β -グルコシダーゼがアントシアニジンルチノシドの β -グルコシド結合は分解せずに、アントシアニジングルコシドの β -グルコシド結合のみを選択的に

分解できる酵素である請求項 4 または 5 記載の精製アントシアニジンルチノシドを製造する方法。

7. β -グルコシダーゼがアーモンド由来の β -グルコシダーゼである請求項 4 乃至 6 記載の精製アントシアニジンルチノシドを製造する方法。
8. 下記の工程を経て結晶性アントシアニジン-3-O-グルコシド塩酸塩・水和物を製造する方法。
 - a) 少なくとも 1 種以上のアントシアニジンルチノシドを含有するアントシアニン組成物にラムノシダーゼを作用させ、アントシアニジンルチノシドをアントシアニジングルコシドに変換する。
 - b) 該アントシアニジングルコシドを精製することにより純度 99% 以上のアントシアニジングルコシドを得る。
 - c) 該アントシアニジングルコシドを塩酸/アルコール系の混合溶媒を用いて結晶化する。
9. 請求の範囲 8 記載の b) 工程の精製法がイオン交換吸着クロマトグラフィーおよび/または HPLC を用いた精製法である請求項 8 記載の結晶性アントシアニジン-3-O-グルコシド塩酸塩・水和物を製造する方法。
10. 塩酸/アルコール系の混合溶媒が 5% (V/V) 塩酸/95% (V/V) メタノールである請求項 8 または 9 記載の結晶性アントシアニジン-3-O-グルコシド塩酸塩・水和物を製造する方法。
11. 請求項 8 乃至 10 のいずれか 1 項記載の方法で得られた結晶性アントシアニジン-3-O-グルコシド塩酸塩・水和物。
12. 下記の工程を経て結晶性アントシアニジン-3-O-ルチノシド塩酸塩・水和物を製造する方法。
 - a) 少なくとも 1 種以上のアントシアニジングルコシドとアントシアニジンル

チノシドを含有するアントシアニン組成物に β グルコシダーゼを作用させてアントシアニジングルコシドを減じせしめる。

b) 該アントシアニジンルチノシドを精製することにより純度 99%以上のアントシアニジンルチノシドを得る。

c) 該アントシアニジンルチノシドを塩酸/アルコール系の混合溶媒を用いて結晶化する。

13. 請求項 12 記載の b) 工程の精製法がイオン交換吸着クロマトグラフィーおよび/または HPLC を用いた精製法である請求の範囲 12 記載の結晶性アントシアニジン-3-O-ルチノシド塩酸塩・水和物を製造する方法。

14. 塩酸/アルコール系の混合溶媒が 5% (V/V) 塩酸/95% (V/V) メタノールである請求項 12 または 13 記載の結晶性アントシアニジン-3-O-ルチノシド塩酸塩・水和物を製造する方法。

15. 請求項 12 乃至 14 のいずれか 1 項記載の方法で得られた結晶性アントシアニジン-3-O-ルチノシド塩酸塩・水和物。

16. 下記の物理的性質を有する結晶性デルフィニジン-3-O-グルコシド塩酸塩・0.5 水和物。

熱分析による融点：258℃

Uv $\lambda_{\max}(\epsilon)$: 517nm (27500)

FAB-MS m/z : M⁺ : 465

組成式 : C₂₁H₂₁O₁₂Cl · 0.5H₂O

元素分析値 : C H Cl

測定値 : 48.00 4.50 6.80

17. 下記の物理的性質を有する結晶性シアニジン-3-O-グルコシド塩酸塩・0.5 水和物。

熱分析による融点：245℃

Uv λ max(ϵ) : 510nm (26300)

FAB-MS m/z : M⁺ : 449

組成式 : C₂₁H₂₁O₁₁Cl · 0.5H₂O

元素分析値 : C H Cl

測定値 : 48.80 4.70 6.90

18. 下記の物理的性質を有する結晶性デルフィニジン-3-O-ルチノシド塩酸塩・

1.5 水和物。

熱分析による融点：224℃

Uv λ max(ϵ) : 520nm (27800)

FAB-MS m/z : M⁺ : 611

組成式 : C₂₇H₃₁O₁₆Cl · 1.5H₂O

元素分析値 : C H Cl

測定値 : 45.80 5.30 5.20

19. 下記の物理的性質を有する結晶性シアニジン-3-O-ルチノシド塩酸塩・0.5 水

和物。

熱分析による融点：214～226℃

Uv λ max(ϵ) : 512nm (27400)

FAB-MS m/z : M⁺ : 595

組成式 : C₂₇H₃₁O₁₅Cl · 0.5H₂O

元素分析値 : C H Cl

測定値 : 50.00 5.30 5.30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P19/14, C09B61/00, C07H17/065

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P19/14, C09B61/00, C07H17/065

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/CA/WPI (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	MATSUMOTO, H. et al., "Preparative-scale isolation of four anthocyanin components of black currant (<i>Ribes nigrum</i> L.) fruits", J. Agric. Food. Chem., March, 2001, 49(3), pages 1541 to 1545	1-19
X A	CATO, F. et al., "Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins-applied on blackcurrant (<i>Ribes nigrum</i>)", Journal of Chromatography A, (1998), 825, pages 89 to 95	11, 15-19 1-10, 12-14
X A	DEGENHARDT, A. et al., "Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity", J. Agric. Food. Chem., February, 2000, 48(2), pages 338 to 343	11, 15-19 1-10, 12-14
X A	JP 3-209321 A (Toray Industries, Inc.), 12 September, 1991 (12.09.91), (Family: none)	11, 16 1-10, 12-15, 17-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
04 December, 2001 (04.12.01)Date of mailing of the international search report
25 December, 2001 (25.12.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07891

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 3-209320 A (Toray Industries, Inc.), 12 September, 1991 (12.09.91), (Family: none)	11, 17 1-10, 12-16, 18, 19
X A	ANDO, T. et al., "Floral anthocyanins in wild taxa of Petunia (Solanaceae)", Biochemical Systematics and Ecology, (1999), 27, pages 623 to 650	11, 15, 16, 18, 19 1-10, 12-14, 17
X A	ALEJANDRO O.G. et al., "Purification and identification of Capulin (Prunus serotina Ehrh)", Food Chemistry, (1999), 65, pages 201 to 206	11, 15, 17, 19 1-10, 12-14, 16, 18
X A	RIKKE N. et al., "Anthocyanins in chilean species of Alstroemeria", Phytochemistry, (1996), 42(1), pages 97 to 100	15, 18, 19 1-14, 16, 17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12P19/14, C09B61/00, C07H17/065

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12P19/14, C09B61/00, C07H17/065

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/CA/WPI (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	MATSUMOTO H. et al., Preparative-scale isolation of four anthocyanin components of black currant (<i>Ribes nigrum</i> L.) fruits. J Agric Food Chem., 2001 Mar, 49(3), p. 1541-5	1-19
X A	CATO F. et al., Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins-applied on blackcurrant (<i>Ribes nigrum</i>) Journal of Chromatography A, 1998, 825, p. 89-95	11, 15-19 1-10, 12-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.12.01

国際調査報告の発送日

25.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	DEGENHARDT A. et al., Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. J Agric Food Chem., 2000 Feb, 48(2), p. 338-43	11, 15-19 1-10, 12-14
X A	JP 3-209321 A(東レ株式会社) 12.9月.1991(12.09.91) ファミリーなし	11, 16 1-10, 12-15, 17-19
X A	JP 3-209320 A(東レ株式会社) 12.9月.1991(12.09.91) ファミリーなし	11, 17 1-10, 12-16, 18, 19
X A	ANDO T. et al., Floral anthocyanins in wild taxa of Petunia (Solanaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 1999, 27, p. 623-650	11, 15, 16, 18, 19 1-10, 12-14, 17
X A	ALEJANDRO OG et al., Purification and identification of Capulin(Prunus serotina Ehrh). Food Chemistry, 1999, 65, p. 201-206	11, 15, 17, 19 1-10, 12-14, 16, 18
X A	RIKKE N. et al., anthocyanins in chilean species of alstroemeria. Phytochemistry, 1996, 42(1), p. 97-100	15, 18, 19 1-14, 16, 17